

El examen serológico con muestras de sangre obtenidas en papel de filtro

Serological blood tests of samples obtained on filter paper

A. Villa, R. Pueyo, JM. Baselga, A. Navarro

Exopol. Pol. Río Gállego, calle D, Parcela 8, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza

Resumen: Se ha puesto a punto una técnica de obtención de sangre total en papel filtro para el muestreo serológico de enfermedades de los conejos tales como: Enfermedad Hemorrágica Viral (RHVD); Encefalitozoonosis; *Chlamydia psittaci* y Mixomatosis. Se propone como alternativa de muestreo para la determinación de anticuerpos, por ser un método sencillo que no requiere muchos cuidados en el envío al laboratorio. Se evaluaron 94 muestras de suero de conejos llegados al laboratorio para el diagnóstico de las entidades antes citadas. Los resultados serológicos de las muestras de sangre total obtenida por venipuntura y en papel filtro, fueron comparados. Los métodos empleados incluyeron: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para detectar IgG, Carbón inmunoensayo (CIA) e Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) para la evaluación de anticuerpos totales. Los resultados de sensibilidad, especificidad, índice de concordancia y valores predictivos positivos y negativos obtenidos en este trabajo fueron satisfactorios y nos permitieron decir que la toma y el transporte de muestras de sangre en papel de filtro es una técnica útil con sensibilidad y especificidad adecuada para realizar estudios seroepidemiológicos en conejos.



Palabras clave: Serología, papel de filtro, pequeños animales, conejos.

Keywords: Serology, filter paper, small animals, rabbits.

Clin. Vet. Peq. Anim, 30 (3): 171-175, 2010

Introducción

Los ensayos serológicos pueden tener dos objetivos diferentes: el diagnóstico de una infección y/o la evaluación del estado inmunitario. Se puede establecer que los exámenes realizados sobre una única dilución, para una encuesta serológica, generan de forma fiable resultados cualitativos (positivo/negativo), considerados suficientes en la mayoría de las ocasiones,^{1,2} tanto para el dictamen de diagnóstico (IgM e IgG), como del estado inmunitario (IgG y anticuerpos totales). Las determinaciones cuantitativas son de aplicación cuando se analizan muestras pareadas, al objeto de demostrar la seroconversión o variaciones significativas en el título de anticuerpos.²

En los conejos, el análisis serológico es de gran importancia para el diagnóstico, prevención y vigilancia de enfermedades de diversas etiologías. La respuesta humoral es predictiva del nivel de protección frente a las infecciones, para la valoración de los títulos de anticuerpos calostrales y post vacunales y tiene un destacado significado en la investigación de animales centinelas de áreas vacunadas de Mixomatosis (RMV) y la Enfermedad Hemorrágica Viral (RHVD), así como en el comercio de semen de animales reproductores seleccionados como no portadores de *Chlamydia* y *Encephalitozoon cuniculi* (Ec), entre otros.³

En la práctica veterinaria, se requiere la extracción de sangre venosa para estudiar los anticuerpos y realizar programas de prevención de enfermedades, que en el caso de micromamíferos, aves, reptiles etc., puede ser

difícil de obtener cuando los encuestados son a mediana y a gran escala, por la dificultad de hacer sangrías de calidad y obtener volúmenes suficientes de muestra.

Fue objetivo del presente trabajo, evaluar la metodología de sangre seca en papel de filtro (PF) y compararla con muestras de sangre obtenidas por venipuntura para la realización de pruebas serológicas de detección de anticuerpos.

Materiales y Métodos

La toma de muestra en PF se realizó previa desinfección del borde marginal de la oreja, se puncionó esta área con una lanceta estéril, y con una ligera presión sobre ella, se depositó la sangre en 4 círculos de 1 cm de diámetro en PF Watman 903. Estos círculos se llenaron por uno de sus lados con una sola aplicación, tocando levemente la gota de sangre obtenida por punción hasta llenar cada círculo por completo sin quitar el papel hasta lograr el llenado total de éstos.

Las muestras de sangre en PF se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 horas hasta su total secado, y se conservaron en sobres plásticos a 4°C. Las muestras de sangre venosa obtenidas por venipuntura fueron centrifugadas a 450 g x 10 minutos para la separación de los sueros, que se conservaron a -20°C.

Para el estudio comparativo de ambos tipos de muestras empleamos 42 conejos llegados al laboratorio con diagnóstico presuntivo de RHVD; 28 bajo sospecha de Ec;

12 vacunados de RMV y 12 para estudios de *Chlamydia psittaci*. De todos los animales se extrajeron sangre en PF y su correspondiente muestra de suero. Se consideró reactiva aquella muestra positiva al menos en una de las técnicas de muestreo empleada frente a sueros positivos de centros de referencia autorizados.

Los resultados obtenidos se compararon mediante el cálculo del índice de concordancia, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) así como en sensibilidad y especificidad.

Inhibición de la hemaglutinación (IHA)

El título IHA es el test de referencia para el diagnóstico serológico de la RHDV. La prueba se realizó siguiendo las recomendaciones de la OIE² a 4° C con glóbulos rojos (RBCs) humanos grupo O Rh+, sueros inactivados a 56° C durante 30 minutos y con doble tratamiento de caolín.

La extracción de los anticuerpos del PF (2 círculos por test) se realizó en tubos eppendorf con 900 µl de PBS 0,02 M pH 6,5 a 4°C durante toda la noche. El papel de filtro fue eliminado y las muestras se clarificaron mediante centrifugación a 450g x 10 minutos y se inactivaron a 56°C durante 30 minutos. Después se le agregó 500 µl de caolín al 25%, con agitación ocasional durante 30 min. a temperatura ambiente y se repitió el tratamiento con caolín para eliminar los inhibidores inespecíficos. La muestra resultante fue tratada como una dilución 1:20 de suero.

El antígeno utilizado en la prueba IHA consistió en hígados de animales con enfermedad clínica, homogenizados y clarificados con títulos hemaglutinantes > 640.

Todas las muestras se estudiaron por duplicado con 7 diluciones log₂ a partir de 1:20 y se compararon frente a 8 unidades hemaglutinantes (UHA) del virus. El anticuerpo monoclonal anti VP60 de Ingenasa se empleó como control positivo de la prueba. El título asignado fue la mayor dilución capaz de inhibir la hemaglutinación provocada por el antígeno viral (8 UHA / 25 µl). El título de valor diagnóstico para los reactivos positivos se consideró ≥ 40 (punto de corte).

Carbón inmunoensayo (CIA)

Para la detección y verificación de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi*, se utilizó el antígeno de células completas de *E. cuniculi* mezcladas con una suspensión de carbón (Kit de Medicago). La extracción de las inmunoglobulinas del PF se realizó con 450 µl de PBS 0,02 M pH 7,2. Las muestras diluidas se mezclaron a partes iguales con el antígeno y 5 µl de ésta se hizo reaccionar con suspensión de carbón. Como control positivo se emplearon sueros de conejos naturalmente infectados (Megacord / Eurovet).

Las muestras se consideraron positivas cuando en la observación microscópica se visualizaban > 10 esporas de *E. cuniculi* por campo de 400x, teñidas en negro en la dilución 1:40 (punto de corte a una dilución).

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se empleó para detectar anticuerpos tipo IgG de Mixomatosis y Chlamydias. La extracción de las inmunoglobulinas de la sangre seca en los discos de PF se realizó con

200 µl PBS 0,02M pH 7,2 y albúmina bovina fracción V al 0,5% a 4°C durante toda la noche, obteniéndose una dilución de 1:100 (punto de corte para ambas test a dilución única).

Para la serología de estas dos entidades se empleó antígeno laminar. En Mixomatosis consistió en la cepa homóloga Lausanne cultivada *in vitro* en nuestro laboratorio y un anticuerpo policlonal de INRA, Francia, como control positivo. En *Chlamydia psittaci*, el antígeno laminar era de Eurovet y el control positivo un anticuerpo policlonal anti Chlamydia género específico de BIOTREND. En ambos casos los inmunocomplejos se revelaron con anti IgG de conejo conjugados con FITC de SIGMA F-1262.

Resultados

La IHA es la prueba estrella para el diagnóstico serológico de la RHDV. Al analizar los resultados de los títulos de anticuerpos de 42 conejos para la entidad RHDV mediante IHA encontramos que entre ambos tipos de muestras, tomadas de un mismo animal, la proporción de acuerdos observados o índice de concordancia fue 0,976, con VPP = 1 y VPN = 0,9 (Tabla 1).

Tabla 1. Diagnóstico serológico de RHDV. Sueros vs sangre seca papel en filtro

IHA en sueros	IHA Papel de filtro		Total
	Positivos	Negativos	
RHDV positivo	31	0	31
RHDV negativo	1	10	11
Total	32	10	42

RHDV: Enfermedad Hemorrágica Viral, IHA: Inhibición de la hemaglutinación. Índice de concordancia = 0,976; VPP = 1; VPN = 0,9

11/42 (26,19%) resultaron no reactivos con títulos < 1:40 mientras que 31/42 (77,38%) de los animales investigados fueron reactivos positivos con valores en los títulos entre 80-1280. El título de anticuerpos en la muestra en PF de 2 conejos reactivos positivos, resultó un factor de dilución menor que el título obtenido con el suero (Fig. 1).

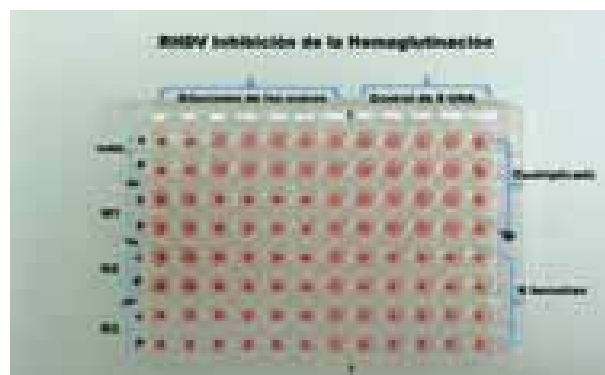


Figura 1. IHA. Se muestran los títulos de anticuerpos de los sueros M1c, M2c, M3c= 640; título de las mismas muestras en papel M1p, M2p, M3p = 640. Títulos del control positivo mAb anti VP 60 = 40 (punto de corte).

El CIA es una prueba comercial estandarizada para la detección de animales infectados por Ec. En el muestreo comparado del suero contra la sangre seca en PF, de los 28 conejos estudiados el índice de concordancia fue de 0,928, con VPP de 0,83 y VPN = 0,9 (Tabla 2).

18/28 (64,28%) de los animales resultaron negativos a la prueba y 10/28 (35,71%) positivos. La intensidad del color negro de los quistes de Ec de la reacción positiva bajo el microscopio no se vio afectada con las muestras en PF (Fig. 2).

Los exámenes de las muestras comparadas tanto RMV como en Chlamydias mediante IFI obtuvieron un acuerdo total, con índice de concordancia = 1; VPP=1 y el VPN = 1 (Tabla 3).

Tabla 2. Diagnóstico serológico de Encephalitozoonosis. Sueros vs sangre seca papel en filtro

CIA en sueros	CIA Papel de filtro		Total
	Positivos	Negativos	
<i>E. cuniculi</i> positivos	8	0	8
<i>E. cuniculi</i> negativos	2	18	20
Total	10	18	28

CIA: Carbón inmunoensayo. Índice de concordancia = 0,928; VPP =0,83; VPN = 0,9

Tabla 3. Diagnóstico serológico Chlamydia y Mixomatosis. Sueros vs sangre seca papel de filtro

IFI sueros	IFI Papel de filtro		Total
	Positivo	Negativo	
Chlamydia positivo	2	0	2
Chlamydia negativo	0	10	10
Mixomatosis positivo	12	0	12
Mixomatosis negativo	0	0	0
Total	14	10	24

IFI: Inmunofluorescencia indirecta. Índice de concordancia = 1; VPP = 1; VPN = 1

Los 12 conejos evaluados para RMV, resultaron positivos (100%), como se esperaba, con los dos tipos de muestras, mientras que en Chlamydias los positivos fueron 2/12 (16,66%) y 10/12 (83,33%) negativas para ambas muestras. La inmunofluorescencia en los dos tests fue intensa en los puntos de corte (Figs. 3 y 4).

La especificidad y sensibilidad del conjunto de los ensayos de 94 muestras sobre papel de filtro fue de 100% y 92,4% respectivamente (Tabla 4).

Discusión

Las preguntas que debíamos responder eran sobre la seguridad de las pruebas diagnósticas. ¿Con qué seguri-



Figura 2. CIA (Carbón inmunoensayo). A: muestra negativa; B muestra positiva. Obsérvese la morfología de *E. cuniculi* y la fuerte reacción con el carbón.

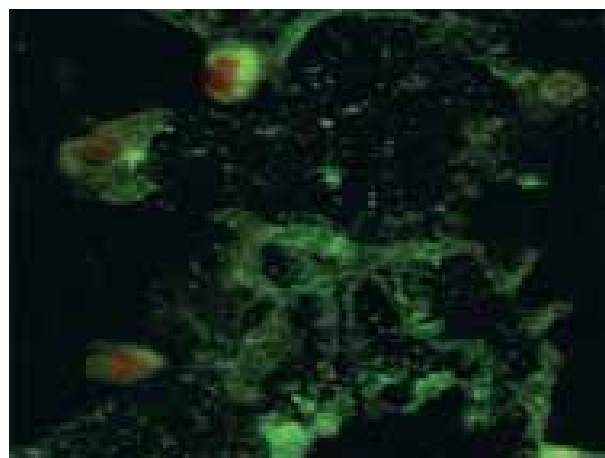


Figura 3. *Chlamydia psittaci*. Reactores positivos ≥ 100 . Obsérvese la inmunofluorescencia verde amarilla con localización extra e intracitoplasmática de los cuerpos elementales.

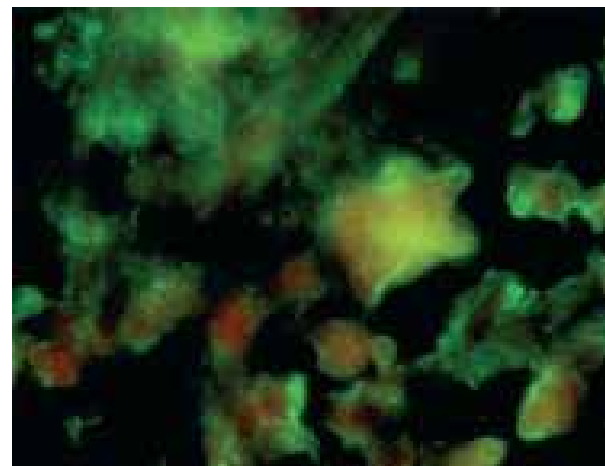


Figura 4. Reactor positivo a Mixomatosis ≥ 100 . Inmunofluorescencia. 400 x.

dad la toma de muestra sobre PF predirá la presencia o ausencia de la enfermedad?. Ante un resultado positivo, ¿qué probabilidad existía de que ese resultado indicase presencia de la enfermedad?.

El método de sangre seca sobre PF debe estar bien estandarizado¹ para que la serología tenga eficacia diagnóstica con repetibilidad en los puntos de corte. El problema con la recogida de sangre en papel filtro es que la cantidad de suero reconstituido puede ser variable si el volumen de sangre, los aspectos técnicos

Tabla 4. Diagnóstico serológico RHDV, Encephalitozoonosis, Chlamydia y Mixomatosis. Sensibilidad y especificidad. Sueros vs sangre seca papel de filtro

	Exámenes con sueros			Especificidad %	Sensibilidad %
	Positivos	Negativos	Total		
Exámenes con PF					
Positivos	53	0	53	100	92,4
Negativos	3	38	38		
Total	56	38	94		

RHDV: Enfermedad Hemorrágica Viral, PF: Papel de filtro

de la recogida y la reconstitución, no están preestablecidos.

En casi todas las especies, el plasma representa, normalmente, el 55% del volumen sanguíneo (dependiendo del hematocrito) y el suero es aproximadamente el 40% del plasma. En este trabajo empleamos para cada test 2 círculos de PF, con área de muestra de 0,79 cm², para aproximadamente 50 µl de sangre, que corresponden a 20 µl de suero.

En el presente trabajo, la puesta a punto y la estandarización incluyeron la evaluación y selección del borde marginal de la oreja para obtener una gota grande de sangre. La relación del volumen de sangre requerido se vinculó con la capacidad de absorción del papel de filtro empleado y el tamaño de los círculos marcados sobre el mismo. La forma de aplicación y el secado total de la muestra antes del envío al laboratorio fue fundamental para la calidad y la buena conservación (Figs. 5, 6 y 7). El pH, la molaridad de los buffer de extracción y el correcto factor de dilución deben respetarse para la repetibilidad de los puntos de corte.

La recolección de sangre total en PF ha sido utilizada en el diagnóstico serológico de diferentes entidades dada su factibilidad en cuanto al traslado, la conservación y la manipulación de las muestras. El muestreo de la sangre sobre PF, ha sido avalado por el alto valor de concordancia de los resultados, y por ello es ampliamente utilizado para realizar encuestas seroepidemiológicas de Tripanosomiasis (Chagas),⁴⁻⁶ HTLV 7,⁸ Dengue⁹ y resulta de especial utilidad en el diagnóstico de enfermedades genéticas⁴ y en pesquises de identificación de individuos con biología molecular.¹⁰

Algunos autores han informado que las variaciones de absorción de la sangre sobre el papel pueden interferir con la detección de anticuerpos^{11, 12} o que puede afectar la especificidad de los ensayos¹³ comparado con el suero total. Otros estudios¹⁴ han demostrado que los títulos de anticuerpos en el suero y la sangre en PF eran 1 ó 2 factores de dilución inferior en comparación con el suero, especialmente para los anticuerpos IgM. Sin embargo, los resultados de la medición de IgG en suero y PF realizado por los mismos autores,¹⁴ mostró un buen acuerdo y sin errores de clasificación de reactivos positivos y negativos confirmando que, con suficiente tamaño de las muestras, la seroprevalencia de los estudios, basados en la detección de anticuerpos IgG extraídos de papel de filtro, representan una herramienta útil para los epidemiólogos.



Figura 5. Localización del área de punción en la oreja. Observe el tamaño de una gota de sangre grande.



Figura 6. Aplicación de la gota a la tarjeta. Obtención de la mancha de sangre por goteo directo.

En nuestro trabajo la detección de IgG y anticuerpos totales en las 94 muestras de sangre de conejos sobre PF certificado Watman, obtuvieron índices de concordancias, VPP y VPN calificados como excelentes ($\geq 0,80$) contra los sueros respectivos frente a RHDV, Mixomatosis, Encephalitozoonosis y Chlamydia. La especificidad y la sensibilidad relativa obtenidos en el presente estudio (100 % y 92,4%, respectivamente) responden a la pregunta sobre la seguridad de los resultados de las pruebas diagnósticas de confirmación de anticuerpos totales e IgG de las entidades estudiadas con este tipo de muestra alternativa. Las diferencias de un factor de dilución, en títulos seriados que se comparan, son con-

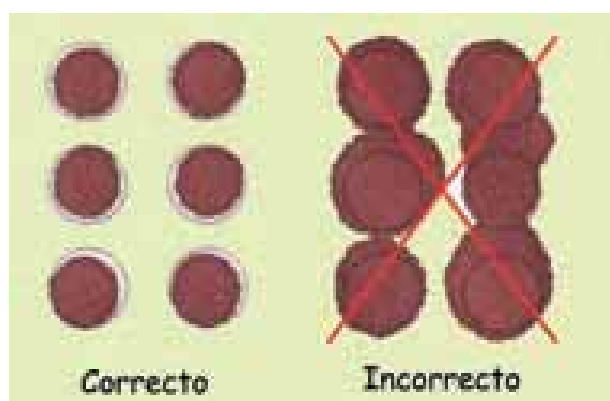


Figura 7. Manchas de sangre secadas al ambiente sobre tarjeta de papel de filtro whatman con círculos (entregadas por el laboratorio). Muestra obtenida correctamente con volumen adecuado y manchas de sangres mezcladas (incorrecto) por exceso de muestra en cada círculo del papel de filtro.

sideradas un resultado admisible en las evaluaciones intraensayos.

La colecta de sangre total en papel de filtro para los ensayos de anticuerpos, tiene sólo ventajas sobre el uso de muestras de suero:^{15, 16} los requerimientos de equipos son mínimos, las lancetas estériles son baratas y el papel de filtro sustituye a las jeringas, tubos, centrífugas y refrigeradores que se necesitan para las muestras de suero.

Al evaluar el sistema de sangre en tarjeta de PF con ambos tipos de muestras, se abren nuevas posibilidades de investigaciones seroepidemiológicas a gran escala con un mínimo de gastos en el procesamiento de las muestras. También podría extenderse a los estudios relacionadas con la epidemiología de especies exóticas y silvestres, que abarcan grandes poblaciones sometidas a vigilancia, cuando el objetivo sea medir la respuesta humoral mediada por anticuerpos.

Summary: We have perfected a technique for obtaining whole blood on filter paper for serological investigation of diseases of rabbits: RHVD; Encephalitozoon; *Chlamydia psittaci* and Myxomatosis and it is being proposed as alternative sampling method for determination of antibodies, as it is a simple method and does not require much care in sending samples to the laboratory. We evaluated serum samples from 94 rabbits arrived at the laboratory for the diagnosis of the conditions mentioned above. Serologic results of whole blood samples obtained by venipuncture and filter paper were compared. The methods used included: indirect Immunofluorescence (IIF) to detect IgG, Carbon Immunoassay (CIA) and Hemagglutination Inhibition (HI) to detect total antibodies. The overall sensitivity, specificity and positive and negative predictive values obtained in this work are satisfactory and enabled us to say that the taking and transport of blood samples on filter paper is a useful and accurate technique for seroepidemiological studies in rabbits.

Bibliografía

- Merino Aguiar JM, Cercenado Mansilla E, de Ori Manchón F, Rojo Martín MD, de la Rosa Fraile M. Procedimientos en Microbiología clínica. Recomendaciones de la sociedad Española de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica. Editores Emilia Cercenado y Rafael Cantón. 2009.
- OIE. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Vol 2. Sección 2. 6. Sixth Edition 2008.
- Rosell, JM, de la Fuente LF, García Ximénez F, Gracia E, Baselga R. Enfermedades de la reproducción en Enfermedades del Conejo. Tomo II. Ediciones Mundi-Prensa, 2000.
- Marinkelle, C.J.; Sánchez, N.; Grogl, M. and Guhl, F. 1978. Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel de filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de la infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia indirecta. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 20 (2): 112-114.
- Serrano, Olga, Mendoza, Florencio, BENNY, Suárez *et al.* Seroepidemiology of Chagas disease in two rural populations in the municipality of Costa de Oro, at Aragua State, northern Venezuela. *Biomédica*, Jan./Mar. 2008, vol.28, no.1, p.108-115. ISSN 0120-4157.
- Prevalencia de la enfermedad de Chagas en niños y mujeres asistidos en centros de atención primaria de la salud de la ciudad autónoma de Buenos Aires. www.bvs.pedriat.org.ar/premios/chagas_2007.doc
- Preux PM, Hovinato DS, Nzisabira L, Verdeir M, Dumas M. The validity of filter paper blood sampling for detection of HTLV 1 seropositive: A Benin study. *AIDS* 2002 Vol17, Nº 12.
- Fortes P, Menitovec J, Ross A, et al. Evaluation of blood collection on filter paper for detection of antibodies to Human Immunodeficiency Virus type 1. *J Clin Microbiol* 1989;17:1380-1381.
- García, María, Cabeza, César, Callajan, Johny et al. Determinación de IgG y anticuerpos totales contra el Virus Dengue, en muestras obtenidas

en papel filtro. *Rev. Perú. med. exp. salud pública*, ene./jul. 1997, vol.14, no.1, p.45-49. ISSN 1726-4634.

10. Penacino AG. Investigación e implementación de sistemas de identificación de individuos por técnicas de biología molecular en www.wiicorp.com/tesis

11. Gomes AHS, Arine ML, Szarota RM, et al. Evaluación de la capacidad de absorción y distribución de muestras de sangre total en diferentes tipos de papel de filtro. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 2004, 63, 262-269.

12. Figueiredo FB, Madeira MF, Menezes RC et al. Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet J.* 2009 Aug 6.

13. Palatnik- de-Sousa, CB, Batista-de-Melo LM, Borja-Cabrera, GP, et al 2004. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 76, 583-593.

14. *BioMed Central*. Inmunoanálisis de enzima vinculada por virus dengue anticuerpos IgM e IgG en suero y sangre en papel filtro. *BMC Infectious Diseases*, 2006; 6: 13-13.

15. Pérez-Guevara MT, Rolo Gómez F, Nibot Sánchez C, et al. Determinación de anticuerpos al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en muestras de sangre seca en papel de filtro. *Rev cubana de Med Trop* 1998, 50(2):93-5.

16. Grana Sánchez R, Pérez-Guevara MT, Lubián Caballero AL, et al. Diagnóstico serológico del VIH-1 en muestras de sangre seca en papel de filtro por el sistema DAVIH Dot VIH-1. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50(3):221-2.

**Un servicio imprescindible
que ayudará a tu negocio
a afrontar los nuevos retos**



VetSupport
consultoría de negocio +



Desde Pfizer Salud Animal queremos ayudarte a través de nuestros consultores de negocio a mejorar la gestión de tu clínica mediante un servicio personalizado y adaptado a tus necesidades.



UNA INVERSIÓN NECESARIA PARA CONTINUAR CRECIENDO

Para más información: vetsupportspain@pfizer.com